

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННОГО АНАЛОГА АС-AMP2 ИЗ АМАРАНТА**А.А. Герасимова^{1,2}, Емельянова Э.М.³, И.В. Богданов², Е.И. Финкина², Т.В. Овчинникова^{1,2,3}**¹ Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Последнее время грибковые заболевания представляют собой серьезную клиническую проблему. Наиболее опасные микозы по данным ВОЗ вызывают грибы родов *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* и *Pneumocystis*. Обострение ситуации вызвано ограниченностью списка конвенциональных антимикотиков и распространением резистентных штаммов грибов. В связи с этим, поиск новых соединений с противогрибковой активностью является крайне актуальной задачей. В роли таких соединений могут быть рассмотрены пептиды врожденного иммунитета растений, в частности гевеинподобные пептиды. Они имеют стабилизированную дисульфидными связями структуру и проявляют выраженную противогрибковую активность в отношении различных фитопатогенов. Одним из таких пептидов является Ас-AMP2 из семян амаранта хвостатого *Amaranthus caudatus*.

Известно, что гевеинподобные пептиды связывают хитин, являющийся компонентом клеточной стенки грибов. В данной работе мы разработали биотехнологический способ получения модифицированного аналога Ас-AMP2, обладающего большим сродством к хитину, и исследовали его активность в отношении патогенных для человека дрожжеподобных грибов. Рекомбинантный пептид был получен путем гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Фрагменты ДНК, кодирующие модифицированный Ас-AMP2 M13A/F18W, получали методом синтеза de novo с помощью ПЦР. Методом безлигазного клонирования синтезированный фрагмент был введен в вектор рЕТ, кодирующий белок-носитель тиоредоксин А и октагистидиновую последовательность под контролем промотора Т7. Правильность сборки генетической конструкции была подтверждена секвенированием. Для проведения экспрессии клетки *E. coli* штамма BL21 трансформировали полученной плазмидой рЕТ-His8-TrxL-Ас-AMP2 M13A/F18W и выращивали на богатой питательной среде с 20 мМ глюкозой и 100 мкг/мл ампициллином при 30 °С. Для индукции экспрессии использовали 0,2 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид. Очистку рекомбинантного пептида проводили из растворимой фракции клеточного белка, используя металлохелатную хроматографию, расщепление гибридного белка бромцианом по искусственно введенному остатку метионина и обращенно-фазовую ВЭЖХ. Высокое качество препарата рекомбинантного пептида было подтверждено методами SDS-электрофореза в ПААГ, MALDI-TOF масс-спектрометрии и КД-спектроскопии.

Противогрибковую активность модифицированного Ас-AMP2 исследовали в 96-ти луночных планшетах в отношении ряда чувствительных и резистентных к производным триазола штаммов *Candida albicans* (ATCC 18804, ATCC 10231, клинические изоляты 9.1 и 8.2). Модифицированный Ас-AMP2 был активен в отношении всех исследуемых штаммов, причем минимальные ингибирующие концентрации (МИК) составляли всего 0,39 или 0,78 мкМ. Микроскопический анализ выявил, что в более высоких концентрациях Ас-AMP2 M13A/F18W вызывал лизис клеток грибов. Высев содержимого лунок с пептидом в концентрациях, равных МИК и выше, выявил, что модифицированный Ас-AMP2 действовал фунгицидно в отношении чувствительного штамма ATCC 18804 и фунгистатически в отношении остальных резистентных штаммов *C. albicans*. Присутствие в ростовой среде солей или компонентов сыворотки приводило к повышению МИК модифицированного пептида, однако его противогрибковая активность все равно была довольно выраженной. Полученный пептид не обладал гемолитической активностью и не проявлял цитотоксические свойства в отношении мононуклеарных клеток периферической крови в концентрации 25 мкМ.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 22-14-00380).